

09/601875

PCT/JP99/00524

日 本 国 特 許 庁

08.02.99

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 2月 9日

REC'D 26 MAR 1999

WIPO PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第041035号

出 願 人
Applicant(s):

東洋鋼板株式会社

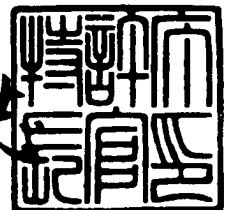
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 3月12日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3013039

【書類名】 特許願

【整理番号】 P0001392

【提出日】 平成10年 2月 9日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C01B 31/06
B01J 19/00

【発明の名称】 化学修飾されたダイヤモンドチップ

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼鋳株式会社
社技術研究所内

【氏名】 丹花 通文

【発明者】

【住所又は居所】 広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号技術研究所
内

【氏名】 高橋 浩二郎

【特許出願人】

【識別番号】 390003193

【氏名又は名称】 東洋鋼鋳株式会社

【代表者】 田辺 博一

【代理人】

【識別番号】 100100103

【弁理士】

【氏名又は名称】 太田 明男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 017385

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

特平10-041035

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 9708037

【書類名】 明細書

【発明の名称】 化学修飾されたダイヤモンドチップ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 末端に極性基を有する化学修飾されたダイヤモンドチップ。

【請求項2】 末端に水酸基を有する化学修飾されたダイヤモンドチップ。

【請求項3】 末端にカルボキシル基を有する化学修飾されたダイヤモンドチップ。

【請求項4】 前記カルボキシル基が、エステル結合を介してダイヤモンド表面に結合している請求項3記載のダイヤモンドチップ。

【請求項5】 前記カルボキシル基が、ペプチド結合を介してダイヤモンド表面に結合している請求項3記載のダイヤモンドチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、化学修飾されたダイヤモンドチップに関し、より詳しくは、末端に水酸基またはカルボキシル基等を有する化学修飾されたダイヤモンドチップに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、DNAの増幅反応においては、目的とするDNAを特定量得るために、
1) DNAヘリックス鎖の水素結合をほどくために試料の温度を95℃に上昇させる、
2) 次いでDNAを複製するためのプライマーと再結合させるために試料の温度を45℃に下降させる、
3) さらに耐熱性ポリメラーゼによりプライマーを伸長させてDNAを複製させるために試料の温度を74℃に上昇させる、
といった1)～3)のヒートサイクルを幾度も繰り返す必要があった。

このようなDNAの増幅反応では、試料を合成樹脂の容器などに入れ、この容器をアルミニウムブロックに収容し前記ヒートサイクルを行っていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、前記ヒートサイクルは多大な時間がかかり、目的とする量のDNAを得るには数日の日数を要していた。また、温度制御の精度が低いために、目的とする以外のDNAも複製されるという問題点もあった。

本発明は、このような問題点に鑑み、DNAを容易に固定化できて、DNA増幅反応によりDNAを複製するためのチップとして使用するのに最適な、化学修飾されたダイヤモンドチップを提供することを技術的課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明の化学修飾されたダイヤモンドチップは、末端に極性基を有することを特徴とする。これらの極性基は、水酸基であることが望ましく、カルボキシル基であることも望ましい。また、カルボキシル基が、エステル結合を介してダイヤモンド表面に結合していることが好適であり、ペプチド結合を介してダイヤモンド表面に結合していることも好適である。

【0005】

【発明の実施の形態】

ダイヤモンドは物質の中でも抜群の熱伝導率を有しており急速に加熱冷却させることが可能であるため、本発明のダイヤモンドチップを用いれば、DNA増幅反応のように、加熱冷却を繰り返すヒートサイクル時間をきわめて短縮できる。

また、本発明のダイヤモンドチップは、表面を水酸基やカルボキシル基等で化学修飾してあるので、DNA等の固定化を容易に行え、DNA増幅反応によりDNAを複製するためのチップなどに最適である。

また、本発明のチップは、表面が汚染された場合に、加水分解させて化学修飾を再生させることができ、高価なダイヤモンドチップを節約できる。

【0006】

本発明に用いるダイヤモンドチップの素材としては、合成ダイヤモンド、高压合成ダイヤモンド、あるいは天然のダイヤモンドなどを用いることができる。またそれらの単結晶あるいは多結晶のいずれの構造を有していても差し支えな

い。生産性の観点から、マイクロ波プラズマCVD法などの気相合成法を用いて製造されたダイヤモンドを用いることが好ましい。

【0007】

次に、上記のダイヤモンドの表面に特定の基を付加（化学修飾）させる。この化学修飾によって、DNAがダイヤモンドの表面に固定化されやすくなる。ダイヤモンド表面に付加（化学修飾）され、末端に極性基を有する特定の基としては、水酸基、カルボキシル基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオル基、アミノ基などの基が該当する。また、この他、有機カルボン酸も含まれる。

【0008】

また、図1に示すように、カルボキシル基は、ダイヤモンドチップとの間に他の炭化水素基（Rで示す）を介し、末端にカルボキシル基を有する基としてもよい。ここで、炭化水素基は炭素数0～10のものが、DNAの固定化にあたって好ましい。炭化水素基となりうるような酸は、蟻酸、酢酸、プロピオン酸などのモノカルボン酸や、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸などのジカルボン酸や、トリメリット酸などの多価カルボン酸などがあげられる。

【0009】

DNA増幅反応に本発明のダイヤモンドチップを適用する場合、耐加水分解性が必要とされる場合と、加水分解させて化学修飾を再生させる必要がある場合との2通りの適用ケースがある。

耐加水分解性が必要とされる場合は、耐アルカリ性を付与するために、上記の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基を、ペプチド結合を介してダイヤモンド表面に結合させることが好ましい。

一方、生成した化学修飾を加水分解させて除去し再生させる必要がある場合は、アルカリ溶液で加水分解可能とするために、上記の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基を、エステル結合を介してダイヤモンドに結合させることが好ましい。

【0010】

炭化水素基の末端に水酸基をダイヤモンド表面に結合させる方法としては、ダ

イヤモンド表面を酸素プラズマで酸化し、次いで水蒸気処理する方法、または塩素ガス中で紫外線照射してダイヤモンド表面を塩素化した後アルカリ溶液中で加水分解してヒドロキシル化する方法、さらにダイヤモンド表面を酸素プラズマで酸化し、次いで塩素化した後アルカリ溶液中で加水分解してヒドロキシル化する方法を挙げることができる。

【0011】

また、炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基をペプチド結合を介してダイヤモンドに結合させる方法としては、塩素ガス中で紫外線照射してダイヤモンド表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、非水溶媒中でカルボン酸クロライドと反応させ、次いで弱アルカリ溶液中で中和させる方法を挙げることができる。

また、炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基をエステル結合を介してダイヤモンドに結合させる方法としては、塩素ガス中で紫外線照射してダイヤモンド表面を塩素化し、次いで非水溶媒中でカルボン酸ソーダと反応させ、次いで弱酸溶液中で中和させる方法、または、ダイヤモンド表面を酸素プラズマで酸化し、次いで塩素化した後アルカリ溶液中で加水分解してヒドロキシル化した後、非水溶媒中でカルボン酸クロライドと反応させ、次いで弱アルカリ溶液中で中和させる方法を挙げることができる。

【0012】

【実施例】

以下、実施例にて本発明を詳細に説明する。

(実施例1)

マイクロ波プラズマCVD法を用いて、直径が64 mm、厚さが0.3 mmのダイヤモンドを気相合成した後、全体が均一な0.25 mmの厚さとなるように表面を研磨した。このようにして研磨した表面の10 mm×10 mmの面積において、FTIR法（フーリエ変換赤外分光分析法）により炭素-水素の伸縮の振動に由来する 2879 cm^{-1} の吸収強度を測定したところ、ほぼ一定の値が得られた。このダイヤモンドからレーザーにより10 mm角の試料を切り出し、以下の実施例1～6の試料として用いた。実施例1においては、マイクロ波により励

起した酸素プラズマでダイヤモンド表面を酸化した後、セパラブルフラスコ中に配置し、フラスコ中の雰囲気の水蒸気で置換した後、水蒸気を流入させながら400℃に加熱し30分間保持した後放冷した。

次いで試料を取り出し乾燥し、末端に水酸基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMS法（二次イオン質量分析法）により、表面研磨後、酸素プラズマ処理後、および水蒸気処理後の水素、水酸基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を1とした場合の水酸基のピーク強度比は、表1に示す値となった。

【0013】

【表1】

水酸基のピーク強度比	
表面研磨後	0.14
酸素プラズマ処理後	0.70
水蒸気処理後	1.14

表1に示すように、水酸基のピーク強度比は、酸素プラズマ処理、それに続く水蒸気処理により増加しており、ダイヤモンド表面が水酸基により化学修飾されていることが確認された。

【0014】

（実施例2）

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより10mm角の試料を切り出した。この試料をセパラブルフラスコ中に配置し、フラスコ中の雰囲気アルゴンをアルゴンガスで置換した後、塩素ガスを1SCCMの流量で流入させながらHg-Xeランプを用い、主波長が3600オングストロームの紫外線を60分間照射してダイヤモンド表面を塩素化した。雰囲気をアルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10重量%の水酸化ナトリウム水溶液中で15分間煮沸し、さらに水洗した後乾燥し、末端に水酸基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMSにより、表面研磨後、塩素化後、および水酸化ナトリウム処理後

の水素、水酸基および塩素基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を1とした場合の、水酸基、塩素基のピーク強度比は表2に示す値となった。

【0015】

【表2】

	ピーク強度比	
	水酸基	塩素基
表面研磨後	0.14	—
塩素化後	0.20	0.50
水酸化ナトリウム処理後	0.47	0.35

表に示すように、水酸基のピーク強度比は、塩素化処理、それに続く水酸化ナトリウム処理により増加しており、ダイヤモンド表面が水酸基により化学修飾されていることが確認された。また、塩素基が減少していることから水酸基により置換されたことが確認された。

【0016】

(実施例3)

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより10mm角の試料を切り出し、マイクロ波により励起した酸素プラズマで表面を酸化した後、実施例2と同様にしてダイヤモンド表面を塩素化した。雰囲気をアルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10重量%の水酸化ナトリウム水溶液中で15分間煮沸し、さらに水洗した後乾燥し、末端に水酸基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMSにより、表面研磨後、酸素プラズマ処理後、塩素化後、および水酸化ナトリウム処理後の水素、水酸基、塩素基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を1とした場合の、水酸基、塩素基のピーク強度比は、表3に示す値となった。

【0017】

【表3】

	ピーク強度比	
	水酸基	塩素基
表面研磨後	0.14	—
酸素プラズマ処理後	0.70	—
塩素化後	0.21	0.47
水酸化ナトリウム処理後	0.54	0.33

表3に示すように、水酸基のピーク強度比は、酸素プラズマ処理、それに続く塩素化、さらにそれに続く水酸化ナトリウム処理により増加しており、ダイヤモンド表面が水酸基により化学修飾されていることが確認された。

また、塩素基が減少していることから水酸基により置換されたことが確認された。

【0018】

(実施例4)

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより10mm角の試料を切り出し、セパラブルフラスコ中に配置し、フラスコ中の雰囲気アルゴンガスで置換した後、塩素ガスを1SCCMの流量で流入させながらHg-Xeランプを用い、主波長が3600オングストロームの紫外線を60分間照射してダイヤモンド表面を塩素化した。再びフラスコ中の雰囲気アルゴンガスで置換した後、1重量%のセバシン酸ソーダのN,N-ジメチルホルムアミド溶液100mlを添加し、セパラブルフラスコにコンデンサを設置し、2時間還流した。次いで試料を取り出し、1重量%の酢酸水溶液で洗浄し、さらにアセトンで洗浄した後乾燥し、セバシン酸がエステル結合を介して結合した、末端にカルボキシル基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMSにより、表面研磨後、塩素化後、およびセバシン酸ソーダ処理後の水素、水酸基、塩素基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を1とした場合の、水酸基、塩素基のピーク強度比は、表4に示す値となった。

【0019】

【表4】

	ピーク強度比	
	水酸基	塩素基
表面研磨後	0.14	—
塩素化後	0.20	0.50
セバシン酸ソーダ処理後	0.40	0.34

表に示すように、水酸基のピーク強度比は、塩素化、さらにそれに続くセバシン酸ソーダ処理により増加していること、またFTIR法を用いて試料表面の炭素-水素の伸縮振動に由来する吸収強度、および炭素-酸素の伸縮振動に由来する吸収強度を測定したところ、いずれの吸収強度も増大していた（ダイヤモンドブランクに対する吸収強度の増大率は約30%であった）。

このことから、ダイヤモンド表面がセバシン酸の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基により化学修飾されていることが確認された。

また、塩素基が減少していることから水酸基により置換されたことが確認された。

【0020】

(実施例5)

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより10mm角の試料を切り出し、マイクロ波により励起した酸素プラズマで表面を酸化した後、実施例2と同様にしてダイヤモンド表面を塩素化した。雰囲気アルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10重量%の水酸化カリウム水溶液中で15分間煮沸してダイヤモンド表面をヒドロキシル基で置換した。乾燥した後、上部に塩化カルシウム乾燥管を備えたコンデンサを設置したセパラブルフラスコ中に試料を配置し、クロロホルム50mlとトリエチルアミン1gを添加し、フラスコ中の雰囲気アルゴンガスで置換した。次いで、セパラブルフラスコを氷冷しながら、クロロホルム50mlに塩化スクシニル10gを溶解させた溶液を徐々に添加した。その後4時間還流した後試料を取り出し、10重量%の炭酸カリ

ウム水溶液で洗浄し、さらにアセトンで洗浄した後乾燥し、マロン酸がエステル結合を介して結合した、末端にカルボキシル基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMSにより、表面研磨後、酸素プラズマ処理後、塩素化後、ヒドロキシル化後、および塩化スクシニル処理後の水素、水酸基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を1とした場合の水酸基のピーク強度比は、表5に示す値となった。

【0021】

【表5】

	水酸基のピーク強度比
表面研磨後	0.14
酸素プラズマ処理後	0.70
塩素化後	0.21
ヒドロキシル化後	0.70
塩化スクシニル処理後	0.50

表に示すように、水酸基のピーク強度比は、酸素プラズマ処理、それに続く塩素化、さらにそれに続くヒドロキシル化、さらにそれに続く塩化スクシニル処理により増加していること、またFTIR法を用いて試料表面の炭素－水素の伸縮振動に由来する吸収強度、および炭素－酸素の伸縮振動に由来する吸収強度を測定したところ、いずれの吸収強度も増大していた（ダイヤモンドブランクに対する吸収強度の増大率は約25%であった）。

このことから、ダイヤモンド表面がマロン酸の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基により化学修飾されていることが確認された。

【0022】

(実施例6)

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより10mm角の試料を切り出し、マイクロ波により励起した酸素プラズマで表面を酸化した後、実施例2と同様にしてダイヤモンド表面を塩素化した。

試料が配置されたセパラブルフラスコ中の雰囲気アルゴンをアルゴンガスで置換した後、アンモニアガスを1SCCMの流量で流入させながらHg-Xeランプを用い、主波長が3600オングストロームの紫外線を60分間照射してダイヤモンド表面をアミノ化した。雰囲気をアルゴンガスで置換した後、セパラブルフラスコ上部に塩化カルシウム乾燥管をそなえたコンデンサを設置し、クロロホルム50mlを添加し、再び雰囲気をアルゴンガスで置換した。

次いで、セパラブルフラスコを氷冷しながら、クロロホルム50mlに塩化スクシニル10gを溶解させた溶液を徐々に添加した。その後4時間還流した後試料を取り出し、10重量%の炭酸カリウム水溶液で洗浄し、さらにアセトンで洗浄した後乾燥し、マロン酸がペプチド結合を介して結合した、末端にカルボキシル基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMSにより、各種処理前、塩素化後、アミノ化後、および塩化スクシニル処理後の水素、水酸基、塩素基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を1とした場合の水酸基、塩素基のピーク強度比は、表6に示す値となった。

【0023】

【表6】

	ピーク強度比	
	水酸基	塩素基
表面研磨後	0.14	—
塩素化後	0.21	0.47
アミノ化後	0.18	0.10
塩化スクシニル処理後	0.58	0.10

表に示すように、水酸基のピーク強度比は、酸素プラズマ処理、それに続く塩素化、さらにそれに続くヒドロキル化、さらにそれに続く塩化スクシニル処理により増加していること、またFTIR法を用いて試料表面の炭素-水素の伸縮振動に由来する吸収強度、および炭素-酸素の伸縮振動に由来する吸収強度を測定したところ、いずれの吸収強度も増大していた（ダイヤモンドブランクに対する吸収強度の増大率は約25%であった）。このことから、ダイヤモンド表面がマロン酸の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基により化学修飾されていることが確認された。

【0024】

実施例1～6のようにして得られた末端にカルボキシル基を有する化学修飾されたダイヤモンドチップを用いてDNAの増幅反応を実施したところ、10～20時間で目的とする量のDNAを得ることができた。

さらに本発明の化学修飾されたダイヤモンドチップを用い、末端水酸基または末端カルボキシル基に、水素結合でオリゴ核酸の末端塩基を固定化し、さらに、このオリゴ核酸と相補的塩基配列を有するDNAを固定して、DNAライブラリチップとして用いることもできる。

また、DNAのかわりに、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNAフラグメント等を、ダイヤモンド表面に固定化して、ライブラリーとすることもできる。

【0025】

【発明の効果】

本発明の化学修飾されたダイヤモンドチップは、熱伝導率が極めて大きいダイヤモンドの素材を用いたことにより、ダイヤモンドチップ上に固定化されたDNAを急速に加熱冷却させることが可能である。このため、DNA増幅反応のように、加熱冷却を繰り返すヒートサイクル時間をきわめて短縮できる。

また、本発明のダイヤモンドチップは、表面を水酸基やカルボキシル基等で化学修飾してあるので、DNA等の固定化を容易に行え、DNA増幅反応によりDNAを複製するためのチップなどに最適である。

また、本発明のチップは、表面が汚染された場合に、加水分解させて化学修飾を再生させることができ、高価なダイヤモンドチップを節約できる。

【図面の簡単な説明】

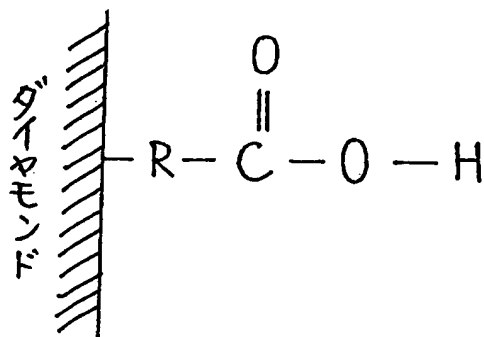
【図 1】

ダイヤモンド表面に、炭化水素基を介してカルボキシル基を化学修飾した例を示す。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNAを固定してDNAライブラリとして、さらにDNA増幅反応によりDNAを複製するためのチップとして使用するのに最適な、化学修飾されたダイヤモンドチップを提供する。

【解決手段】 ダイヤモンド表面に水酸基を結合させるか、または末端にカルボキシル基を有する、炭化水素基とカルボキシル基が結合してなる基を、エステル結合またはペプチド結合をを介して、ダイヤモンド表面に結合させる。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 390003193
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関1丁目4番3号
【氏名又は名称】 東洋鋼鋳株式会社

【代理人】

申請人
【識別番号】 100100103
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関一丁目4番3号 東洋鋼鋳株式
式会社内
【氏名又は名称】 太田 明男

特平10-041035

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390003193]

1. 変更年月日 1990年10月11日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区霞が関1丁目4番3号
氏 名 東洋鋼鋳株式会社
